

Aus dem Biochemischen Institut Freiburg i. Br.
Direktor: Professor Dr. Helmut Holzer

**Beeinflussung der de novo Synthese von
Pyrimidinnucleotiden durch präformierte
Basen und Nucleoside in
Ehrlich-Ascites-Tumor-Zellen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Medizinischen Doktorwürde
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg i. Br.

vorgelegt von

Klaus Resch
geboren in Berlin

1966
—

Aus dem Biochemischen Institut Freiburg i. Br.
Direktor: Professor Dr. Helmut Holzer

**Beeinflussung der de novo Synthese von
Pyrimidinnucleotiden durch präformierte
Basen und Nucleoside in
Ehrlich-Ascites-Tumor-Zellen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Medizinischen Doktorwürde
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Albert-Ludwigs-Universität zu Freiburg i. Br.

vorgelegt von

Klaus Resch

geboren in Berlin

1966



Dekan: Professor Dr. Hans-U. Zollinger

Referent: Professor Dr. Helmut Holzer

Ich danke Herrn Professor Dr. Helmut Holzer für die
Überlassung eines Arbeitsplatzes in seinem Institut
und für sein Interesse am Fortgang der Arbeit.

Besonders danken möchte ich Herrn Dr. A.W. Holldorf,
der mich immer bei meiner Arbeit unterstützt hat.
Mein Dank gilt ihm vor allem dafür, daß er mich in
die biochemische Arbeitsmethodik und Denkweise ein-
geführt hat und daß er ein ermutigendes Beispiel
gab, in der Biochemie als Mediziner zu arbeiten.

Über wesentliche Teile der vorliegenden Arbeit wurde vom Verfasser auf der Tagung der "Gesellschaft für Physiologische Chemie" am 9.10.1965 in Berlin berichtet.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543124_0057

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1	Einleitung
	1
1,1	Einführung
	1
1,2	Synthese von Uridin-5'-phosphat aus Aspartat und Carbamylphosphat
	1
1,3	Bildung der anderen Pyrimidinnucleotide aus Uridin-5'-phosphat
	3
1,4	Möglichkeiten der Verwertung freier Basen und Nucleoside zur Biosynthese der Nucleinsäuren
	4
1,5	Einbauwege von präformierten Pyrimidinbasen und Nucleosiden
	5
1,6	Fragestellung dieser Arbeit
	7
2	Material und Methoden
	8
2,1	Material
	8
2,1,1	Ehrlich-Ascites-Tumorzellen
	8
2,1,2	Lösungen
	8
2,2	Inkubation der Zellen
	9
2,3	Extraktion und Hydrolyse der Nucleinsäuren
	9
2,3,1	Prinzip
	9
2,3,2	Ausführung
	10
2,4	Konzentrationsbestimmung der Hydrolysate
	11
2,5	Chromatographie
	11
2,6	Zählung der Radioaktivität
	12
3	Ergebnisse
	14
3,1	Übersicht
	14
3,2	Beeinflussung des Einbaues von C^{14} -Aspartat in die Pyrimidinnucleotide durch Pyrimidinbasen und Pyrimidinnucleoside
	15
3,2,1	Versuch mit Uracil
	15
3,2,2	Versuch mit Uridin
	15
3,2,3	Versuch mit Cytosin
	17
3,2,4	Versuch mit Cytidin
	20
3,2,5	Versuch mit Thymin
	20
3,2,6	Versuch mit Thymidin
	22

3,3	Beeinflussung des Einbaues von C ¹⁴ - Formiat in die Thyminnucleotide durch Thymin und Thymidin	24
4	Diskussion	26
5	Zusammenfassung	31
6	Literatur	32

Verzeichnis der Abkürzungen

ATP	Adenosin-5'-triphosphat
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
RNS	Ribonucleinsäure
DNS	Desoxyribonucleinsäure
C	Cytosin
CR	Cytidin
CdR	Desoxycytidin
CMP	Cytidin-5'-phosphat
dCMP	Desoxycytidin-5'-phosphat
CDP	Cytidin-5'-diphosphat
dCDP	Desoxycytidin-5'-diphosphat
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
OMP	Orotidin-5'-phosphat
T	Thymin
TdR	Thymidin
TMP	Thymidin-5'-phosphat
TDP	Thymidin-5'-diphosphat
TTP	Thymidin-5'-triphosphat
U	Uracil
UR	Uridin
UdR	Desoxyuridin
UMP	Uridin-5'-phosphat
dUMP	Desoxyuridin-5'-phosphat
UDP	Uridin-5'-diphosphat
UTP	Uridin-5'-triphosphat

1. Einleitung

1,1

Für die Biosynthese der Nucleinsäuren benötigt die Zelle Nucleosidtriphosphate. Die Synthese dieser Nucleotide kann in der Zelle auf zwei verschiedenen Wegen erfolgen. Einmal durch die eigentliche de novo Synthese der Nucleotide aus einfachen Bausteinen und zum anderen durch die Verwertung von präformierten Vorstufen, nämlich von freien Purin- und Pyrimidinbasen und der entsprechenden Nucleoside ("salvage pathway"). Diese Vorstufen können sowohl aus dem endogenen Abbau von Nucleinsäuren entstehen als auch von außen z.B. mit der Nahrung zugeführt werden.

1,2

Einen Überblick über die Reaktionen der de novo Synthese der Pyrimidinnucleotide und über die Verwertung der freien Pyrimidinbasen und Pyrimidinnucleoside gibt Abb. 1. Die de novo Synthese nimmt ihren Ausgang vom Aspartat und Carbamylphosphat. Diese werden durch das Enzym Aspartattranscarbamylase (69) in einer reversiblen Reaktion zu Ureidosuccinat umgesetzt. Ureidosuccinat wird weiter durch die Dihydroorotase (50) zu Dihydroorotat überführt. Bei dieser Reaktion, die ebenfalls reversibel ist, erfolgt der Ringschluß. Das Dihydroorotat wird durch die Dihydroorotatdehydrogenase (51) zu Orotat reduziert. Wasserstoffacceptor bei dieser Reaktion sind NAD oder NADP. Diese übernehmen den Wasserstoff von FMN-H₂ bzw. FAD-H₂, die in fest gebundener Form im Enzym enthalten sind und den Wasserstoff unmittelbar von der Dihydroorotsäure aufnehmen (31).

In der nächsten Reaktion wird die freie Orotsäure in das Orotidin-5'-monophosphat (52) überführt. Die Reaktion wird durch die Orotidinmonophosphat-Pyrophosphorylase katalysiert. Reaktionspartner der Orotsäure ist dabei das 5'-Phosphoribosyl-1'-Pyrophosphat (53). Bei dieser Pyrophosphorylasereaktion entstehendes anorganisches Pyrophosphat wird sehr rasch durch Pyrophosphatasen in Orthophosphat

gespalten (45). Dadurch wird die sonst leicht reversible Reaktion ganz in Richtung auf die Synthese von Orotidin-5'-monophosphat gelenkt. In gleicher Weise wird die Reaktionssequenz durch das nächste Enzym, die Orotidin-5'-monophosphat-Decarboxylase in Richtung auf die Nucleotidsynthese gelenkt, indem in einer irreversiblen Reaktion das Orotidin-5'-monophosphat zu Uridin-5'-monophosphat decarboxyliert wird (52).

1,3

Das Uridin-5'-monophosphat nimmt eine zentrale Stellung in der Synthese der weiteren Pyrimidinnucleotide ein. Durch reversibel arbeitende Nucleosid-5'-monophosphat- und Nucleosid-5'-diphosphat-Kinasen (83,7,48) wird es in Uridin-5'-diphosphat und Uridin-5'-triphosphat überführt. Als Donator der energiereich gebundenen Phosphatreste fungiert das ATP.

Vom Uridin-5'-triphosphat ausgehend erfolgt die Synthese des Cytidin-5'-triphosphats. Bei dieser Reaktion können freies Ammoniak (54) oder Glutamin (42) die Aminogruppe liefern. Die für die Reaktion erforderliche Energie wird durch ATP bereitgestellt. In gleicher Weise wie bei den Uracil-Nucleotiden kann das Cytidin-5'-triphosphat durch Nucleosid-5'-monophosphat- und Nucleosid-5'-diphosphat-Kinasen in Cytidin-5'-diphosphat und Cytidin-5'-monophosphat überführt werden.

Die Biosynthese der Pyrimidindesoxyribonucleotide nimmt in tierischen Zellen ihren Ausgang vom Cytidin-5'-diphosphat. Dieses wird durch das Nucleosiddiphosphat-Reductase-System (70,58) zum Desoxycytidin-5'-diphosphat reduziert. Dieses wiederum kann durch Desoxyribonucleosid-5'-diphosphat-Kinasen (55) in Desoxycytidin-5'-monophosphat überführt werden. Das Monophosphat wird durch eine spezifische Desaminase (75,56) zu Desoxyuridin-5'-monophosphat desaminiert, das die Ausgangssubstanz für die Synthese der Thymidin-

nucleotide bildet. Diese werden durch Methylierung von Desoxy-5'-monophosphat gebildet (27,85). Als Donatoren der Methylgruppe kommen Ameisensäure und Serin in Betracht. Als Coenzym der Übertragungsreaktion ist Tetrahydrofolsäure wirksam. Das zuerst gebildete Thymidinnucleotid ist somit das Thymidin-5'-monophosphat. Dieses kann analog zu den bereits erwähnten Nucleotiden zu Thymidin-5'-diphosphat und Thymidin-5'-triphosphat phosphoryliert werden. Damit liegen alle zur Biosynthese der Ribonucleinsäure (79) und Desoxyribonucleinsäure (46) erforderlichen Pyrimidinribonucleosid- und -desoxyribonucleosid-5'-triphosphate vor.

1,4

Als präformierte Bausteine können einer Zelle die freien Purin- und Pyrimidinbasen und die entsprechenden Nucleoside angeboten werden. Für die freien Basen wurde bereits sehr früh in Fütterungsversuchen an Ratten gezeigt, daß diese kaum oder nicht für die Synthese von Nucleinsäuren in der Leber verwandt werden (61,6,74). Dagegen konnte am Dünndarm der Ratte, am Flexner-Jobling-Carcinom (38), sowie an Hepatomen, die durch 2-Azetylaminofluoren induziert wurden (74), eine Verwertung von freiem Uracil für die Polynucleotidbildung demonstriert werden. In ähnlicher Weise ließ sich am Knochenmark von Kaninchen eine beträchtliche Incorporation von markiertem Adenin nachweisen (1,2). Für die Rattenleber schließlich konnte später ebenfalls gezeigt werden, daß nach Gabe von hohen Konzentrationen markierten Uracils ebenfalls ein meßbarer Einbau dieser Base in die Polynucleotide erfolgt (16). Diesen genannten Fällen einer Verwertung freier Basen für die Polynucleotidsynthese stehen mehr Beobachtungen gegenüber, in denen keine oder nur eine geringe Verwertung von freien Basen für die Polynucleotidsynthese nachgewiesen wird (77). Dies trifft besonders für Mikroorganismen zu (78, 47).

Einheitlicher ist die Situation bei den Nucleosiden. Für diese konnte in vielen Fällen eine recht intensive Verwertung für die Synthese von Nucleinsäuren beobachtet werden (22,72,36,65,37,28,71,29,10). Bei Mikroorganismen dagegen ist die Verwertung von Nucleosiden ebenso wie die Verwertung von freien Basen für die Polynucleotidsynthese gering.

1,5

Die Wege der Verwertung von präformierten Pyrimidinbasen und Pyrimidinnucleosiden gibt ebenfalls Abb. 1 wieder. Von den freien Basen können Uracil und Thymin unter bestimmten Umständen von den Zellen aufgenommen und unmittelbar für die Synthese von Nucleotiden verwertet werden. Die Base Cytosin dagegen wird vor ihrer Verwertung im Nucleinsäurestoffwechsel zunächst zu Uracil desaminiert (18).

Uracil kann auf drei verschiedenen Wegen für Synthesen verwertet werden.

- a) Durch die Uridinphosphorylase (60) kann es in das Ribonucleosid Uridin überführt werden:



Völlig analog erfolgt die Umsetzung durch die Pyrimidin-desoxyribonucleosidphosphorylase (30,68) zu Desoxyuridin:



Während das zur ersten Reaktion erforderliche Zuckerphosphat über Ribose-5-phosphat aus dem Pentosephosphatcyclus gebildet werden kann, ist bisher ungeklärt, in welcher Weise das für die Bildung der Desoxyribonucleoside erforderliche Desoxyribose-1-phosphat entsteht. Durch Einbauversuche mit markierten Intermediärprodukten (3) ließ sich zeigen, daß über die Phosphodesoxyribomutase (80) und über die Desoxyribose-5-phosphat-Aldolase (66,64) Desoxyribose-1-phosphat nach der folgenden Sequenz ledig-

lich abgebaut, jedoch nicht neu synthetisiert wird, obwohl beide Reaktionen recht gut reversibel sind:



Der Beobachtung, daß dieser Sequenz nur katabolische Funktionen zukommen, stehen jedoch jüngere Untersuchungen gegenüber (35), die auch für eine Bedeutung dieser Reaktionsfolge für die Biosynthese der Desoxyribose in Nucleotiden tierischer Gewebe sprechen.

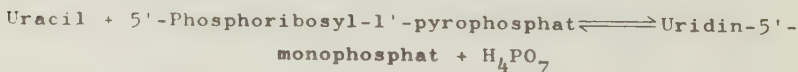
Uridin und Desoxyuridin können dann schließlich mittels ATP durch die Uridinkinase (17) bzw. Thymidinkinase (59) zu Uridin-5'-monophosphat bzw. Desoxyuridin-5'-monophosphat phosphoryliert werden.

- b) Eine weitere Möglichkeit zur Bildung von Nucleosiden aus freien Basen besteht im Transfer des Zuckers von einer Base auf eine andere:



Derartige Austauschreaktionen werden durch Enzyme aus Milchsäurebakterien katalysiert (57,73) und sollen auch in der Leber ablaufen (21), jedoch ist hier über ihre quantitative Bedeutung bisher nichts bekannt.

- c) Ein dritter Reaktionsweg führt unmittelbar von der freien Base Uracil zum Nucleotid Uridin-5'-monophosphat. Ein Enzym, das diese Reaktion katalysiert, wurde bisher jedoch nur in einigen Mikroorganismen (20), nicht aber in tierischen Zellen nachgewiesen. Die Reaktion verläuft analog zur Bildung von Orotidin-5'-monophosphat aus Orotsäure und 5'-Phosphoribosyl-1'-pyrophosphat:



Thymin wird entsprechend der ersten Reaktionssequenz der Verwertung von Uracil durch die Pyrimidindesoxyribonucleosid-Phosphorylase (30,68) und die Thymidinkinase (59) in Thymidin-5'-monophosphat überführt. Sowohl die de novo Synthese der Pyrimidinnucleotide als auch die Verwertung von präformierten Vorstufen werden durch verschiedene Regulationsmechanismen kontrolliert (zusammenfassende Darstellungen: 86,12).

1,6

Weitgehend ungeklärt ist jedoch bisher, wie der Prozeß der de novo Synthese von Nucleotiden in der Zelle mit der Verwertung von präformierten Bausteinen koordiniert wird. Um Einblicke in diese Zusammenhänge zu erhalten, wurde an Ehrlich-Ascites-Tumorzellen die de novo Synthese von Pyrimidinnucleotiden durch den Einbau von C^{14} -Aspartat bzw. C^{14} -Formiat in die Nucleinsäuren gemessen und der Einfluß von verschiedenen Konzentrationen nichtmarkierter Basen und Nucleoside auf diese Inkorporation untersucht.

2. Material und Methoden

2,1,1

Ascites-Tumor-Zellen:

Etwa 6 Wochen alten Mäusen (Stamm des US-Naval Medical Research Institute, Baltimore/USA) werden Ehrlich-Ascites-Tumorzellen (0,25 ml frisch abgenommene Ascitesflüssigkeit) intraperitoneal überimpft. 8 Tage nach Transplantation wird der gebildete Ascites abgenommen und in isotone Kochsalzlösung mit EDTA in einer Konzentration von 10^{-3} M aufgenommen. Die Zellen werden zweimal mit eiskalter isotoner Kochsalzlösung gewaschen und als 50% Zellsuspension in Krebs-Ringer-Phosphat-Puffer (84) aufgenommen. Zentrifugiert wird bei höchstens 300 x g.

2,1,2

Lösungen:

50% Zellsuspension: siehe 2,1,1

Ascitesserum: Mäusen werden intraperitoneal Ehrlich-Ascites-Tumorzellen überimpft. 12-14 Tage nach dem Überimpfen wird der Ascites abgenommen. Die Zellen werden abzentrifugiert. Das Serum wird durch zweimaliges Erhitzen auf 56° C für jeweils eine Stunde inaktiviert. Denaturiertes Protein wird durch Zentrifugation abgetrennt.

Nichtmarkiertes L-Aspartat 0,005 M (Calbiochem AG, Luzern/Schweiz)

Glucose 0,1 M

C^{14} -L-Aspartat: 106 mC/m Mol; 50 μ C/ml; (The Radiochemical Centre, Amersham/England)

C^{14} -Formiat: 30,5 mC/m Mol; 200 μ C/ml; (The Radiochemical Centre, Amersham/England)

Pyrimidinbasen: 25 μ Mol/ml (Calbiochem AG, Luzern/Schweiz)

Pyrimidinnucleoside: 50 μ Mol/ml (Schweiz)

Die Konzentrationen der Lösungen werden spektrophotometrisch überprüft.

Alle Substanzen sind in Krebs-Ringer-Phosphat-Lösung (84) gelöst.

2,2

Inkubation der Zellen:

Standardansatz: 1,0 ml Zellsuspension
1,0 ml Ascitesserum
0,05 - 0,10 ml nichtmarkiertes L-Aspartat
0,1 ml Glucoselösung
0,05 - 0,10 ml C^{14} -Aspartat
Krebs-Ringer-Phosphatpuffer bis zu einem
Gesamtvolumen von 3,0 ml

Bei den Versuchen mit C^{14} -Formiat entspricht der Ansatz vollständig dem bei den Versuchen mit C^{14} -Aspartat verwandten Ansatz. Anstelle von markiertem und nichtmarkiertem Aspartat werden jedoch 0,1 ml der C^{14} -Formiat-Lösung zugegeben. Der Zusatz von Nucleosiden und Basen erfolgt wie auf den Abbildungen angegeben.

Vor dem Zusatz von markiertem Aspartat bzw. Formiat wird 15 min bei $37^{\circ}C$ geschüttelt. Anschließend wird weiter unter leichtem Schütteln bei $37^{\circ}C$ 120 min inkubiert.

Die Inkubation wird durch rasches Abkühlen auf $3 - 4^{\circ}C$ gestoppt. Die Zellen werden sofort abzentrifugiert und mehrfach mit eiskalter isotoner Kochsalzlösung gewaschen.

2,3

Extraktion und Hydrolyse der Nucleinsäuren

2,3,1

Die Isolierung und Hydrolyse der Nucleinsäuren in Anlehnung an das Verfahren von Herbert und Potter (39)

Die Zellen werden durch Zentrifugation abgetrennt. Kalt säurelösliche Bestandteile werden mit $HClO_4$ entfernt. Die Nucleinsäuren werden durch 10% NaCl bei $100^{\circ}C$ extrahiert. Aus der Kochsalzlösung werden diese durch 95% Alkohol in der Kälte ausgefällt und mit Alkohol/Äther entfettet.

Ribonucleinsäuren und Desoxyribonucleinsäuren werden nach Fleck und Munro (25) getrennt. Die Nucleinsäuren werden in 0,3 N KOH gelöst und bei 37°C geschüttelt. Die Ribonucleinsäuren werden dabei zu Nucleotiden hydrolysiert. Die noch hochpolymere Desoxyribonucleinsäure wird durch Ansäuern ausgefällt und anschließend nach Wyatt (87,88) durch Ameisensäure zu den freien Basen hydrolysiert.

Die Ribonucleotide werden durch saure Hydrolyse in ein Gemisch von Purinbasen und Pyrimidinnucleotiden überführt (81).

2,3,2

Die abzentrifugierten Zellen werden in 5 ml 0,25 N HClO_4 gelöst und 10 min in der Kälte stehen gelassen. Das Sediment wird durch Zentrifugation (5 min bei 5000 x g) abgetrennt. Diese Extraktion kalt säurelöslicher Bestandteile mit HClO_4 wird einmal wiederholt.

Das Sediment wird in 1,5 ml 10% NaCl suspendiert und mit 1 N KOH auf pH 7,0 eingestellt. Eine genaue Einstellung des pH-Wertes ist wichtig für eine quantitative Extraktion der Nucleinsäuren. Der Ansatz wird 30 min bei 100°C gehalten. Unlösliches Material wird abzentrifugiert (10 min bei 5000 x g) und erneut in gleicher Weise 15 min lang extrahiert. Aus den vereinigten Überständen (ca. 3 ml) werden die Nucleinsäuren mit 7 ml Äthanol (95%) ausgefällt (12 h bei -16°C).

Die Nucleinsäuren werden mit 5 ml eines Äthanol/Äther-Gemisches (2:1) 30 min bei 50°C und anschließend mit dem gleichen Volumen Äthanol (95%) entfettet.

Das abzentrifugierte und luftgetrocknete Nucleinsäuregemisch wird in 1,0 ml 0,3 N KOH gelöst und 60 min lang bei 37°C kräftig geschüttelt. Die Desoxyribonucleinsäure wird durch Zugabe von 0,3 ml 5 N HCl ausgefällt und durch Zentrifugieren (10 min bei 5000 x g) abgetrennt. Im Überstand sind die Ribonucleotide in etwa 1 N HCl enthalten. Durch

Erhitzen auf 100°C 60 min lang im verschlossenen Gefäß erhält man ein Gemisch aus Purinbasen und Pyrimidinnucleotiden, das chromatographisch sehr gut getrennt werden kann.

Die abzentrifugierte Desoxyribonucleinsäure wird erneut luftgetrocknet und in 1 ml reiner Ameisensäure gelöst. Im zugeschmolzenen Bombenrohr wird die Lösung 30 min lang auf 175°C erhitzt.

2,4

Konzentrationsbestimmung

Die Ribonucleinsäure- und Desoxyribonucleinsäurehydrolysate werden gefriergetrocknet. Dabei wird auch die Ameisensäure entfernt. Das Ribonucleinsäurehydrolysat wird in 0,5 ml H_2O aufgenommen, das Hydrolysat der Desoxyribonucleinsäure in 0,5 ml HCl . Die Konzentrationen des Gemisches der Pyrimidinnucleotide und der Purinbasen aus den Ribonucleinsäuren und des Basengemisches aus den Desoxyribonucleinsäuren werden spektralphotometrisch durch Absorptionsmessung bei 260 $\text{m}\mu$ bestimmt. Die Absorptionskoeffizienten der Gemische werden nach Daten von Beaven und Holyday (4) berechnet. Für den Quotienten $A + T/G + C$ wird ein Wert von 1,24 angenommen (49). Für das Ribonucleinsäurehydrolysat ergibt sich danach ein Wert von 9,6 E/m Mol/l, für das Desoxyribonucleinsäurehydrolysat von 8,9 E/m Mol/l (E = Extinktionseinheiten bei 260 $\text{m}\mu$).

2,5

Chromatographie

Die Trennung der Hydrolyseprodukte erfolgt papierchromatographisch (87,88). Lösungsmittelsystem: Isopropanol/ HCl / H_2O .

Isopropanol	680 ml
HCl konz.	164 ml
H_2O	ad 1000 ml

Papier: Whatman Nr. III

Laufzeit: 24 Stunden absteigend

Je Probe werden 4 μ Mol des Gesamthydrolysates in einem 3 cm breiten Strich aufgetragen.

Für die Pyrimidinnucleotide und Basen werden folgende Rf-Werte ermittelt:

Uridinmonophosphat	0,64
Cytidinmonophosphat	0,53
Adenin	0,32
Guanin	0,22
Cytosin	0,47
Thymin	0,72

2,6

Zählung der Radioaktivität:

Die Flecken auf den Chromatogrammen, die Basen bzw. Nucleotide enthalten, werden in gleich großen Rechtecken (4 x 5 cm) ausgeschnitten.

Die Radioaktivität wird durch Scintillationszählung im Tri-Carb-Liquid-Scintillations-Spektrophotometer (Modell 314) direkt auf Papier oder nach vorheriger Elution gezählt.

Scintillatorlösungen:

Für wasserfreie Proben (z.B. Papier): Toluol-Scintillator

1000 ml	Toluol
4,0 g	2,5-Diphenyloxazol
0,1 g	1,4-bis-2-(4-methyl-5-phenyl-oxazolyl)-Benzol

Für Proben in wäßriger Lösung:

Dioxan-Dimethyloxyäthan-Anisol-Scintillator

750 ml	Dioxan
125 ml	Dimethoxyäthan
7,0 g	2,5-Diphenyloxazol
50 mg	1,4-bis-2-(4-methyl-5-phenyl-oxazolyl)-Benzol

Zählung direkt auf Papier: Die Rechtecke werden in gleich große Streifen (2 x 5 cm) zerschnitten und in Gläsern mit je 15 ml Scintillationsflüssigkeit gezählt. Zähldauer 10 min. Die Leerwerte werden ebenfalls 10 min gezählt und von den für die Proben ermittelten Werten abgezogen.

Elution und Zählung: Die ausgeschnittenen Flecke aus den Chromatogrammen, die die Basen und Nucleotide enthalten, werden in kleine Stücke zerschnitten und 20 Stunden in 25 ml 0,1 N HCl geschüttelt. Das Papier wird abfiltriert. Die Proben werden gefriergetrocknet und anschließend in 0,2 ml H₂O aufgenommen. Durch Absorptionsmessung wird die Konzentration der Basen- und Nucleotidgemische bestimmt (siehe 2,4). Zur Radioaktivitätsmessung werden die Proben in 15 ml Scintillationsflüssigkeit gezählt. Zähldauer 10 min.

3. Ergebnisse

3,1

Mit der im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Methodik wird der Einfluß der freien Basen Uracil, Cytosin und Thymin sowie der Nucleoside Uridin, Cytidin und Thymidin auf den Einbau von C^{14} -Aspartat in die Pyrimidinbasen von RNS und DNS untersucht. Der Aspartateinbau wird dabei als Ausdruck für die de novo Synthese der einzelnen Nucleotide in den Nucleinsäuren gewertet. Die Ergebnisse dieser Experimente werden in den Abb. 2 - 7 wiedergegeben. In diesen wird der Einbau von C^{14} -Aspartat in die Nucleotide in Abwesenheit von exogen zugeführten Basen bzw. Nucleosiden als Kontrolle bezeichnet und gleich 100% C^{14} -Aspartat-Einbau gesetzt.

3,2,1

Abb. 2 zeigt zunächst die Wirkung von freiem Uracil auf den Einbau von markiertem Aspartat. Dabei ergibt sich, daß durch Uracilkonzentrationen von etwa $1 \mu\text{Mol/ml}$ ($= 10^{-3} \text{ M}$) der Einbau in alle vier Pyrimidinbasen von RNS und DNS verringert wird. Quantitativ bestehen dabei Unterschiede in der Wirkung auf den Einbau in die einzelnen Basen. Eine Verringerung des Einbaues von etwa 25% wird beim Uracil der RNS und beim Cytosin der DNS beobachtet, während der Einbau in das Cytosin der RNS und das Thymin der DNS nur um etwa 10% gesenkt wird. Mit steigenden Uracilkonzentrationen kommt es schließlich in allen Fällen zu einer Verringerung der Einbauhemmung und bei den Basen der DNS sogar zu einer Steigerung der Aspartatinkorporation über den Kontrollwert.

3,2,2

Das Nucleosid Uridin (Abb. 3) zeigt einen viel einheitlicheren Effekt auf den Einbau von Aspartat. In allen Fällen wird der Einbau zunächst durch steigende Uridinkonzentrationen verringert und nähert sich dann bei Konzentrationen von 2,0 bis $2,5 \mu\text{Mol/ml}$ einem konstanten Spiegel. Höhere Konzentrationen bleiben ohne größere Wirkung. Quantitativ gesehen

Beeinflussung des Einbaus von L-C¹⁴-Aspartat
durch Uracil

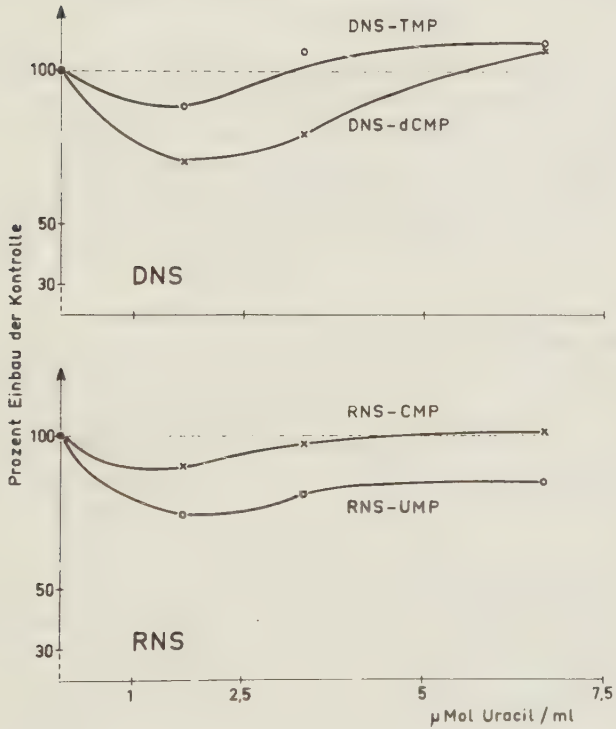


Abbildung 2

Beeinflussung des Einbaus von L-C¹⁴-Aspartat durch Uridin

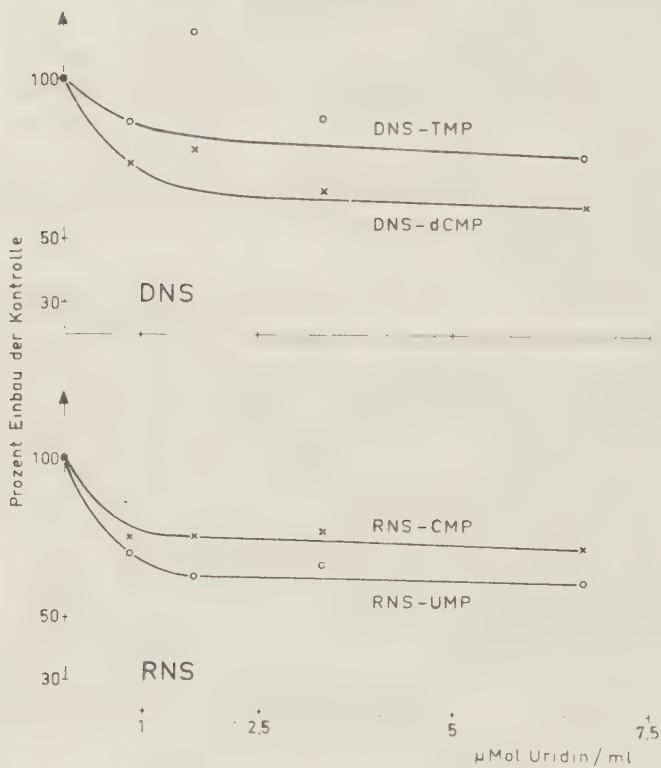


Abbildung 3

sind die Effekte des Uridins ebenso wie die des Uracils stärker beim Einbau von Aspartat in das Uracil der RNS und in das Cytosin der DNS als in das Thymin der DNS und in das Cytosin der RNS. Eine Deutung dieser Beobachtung wird später (siehe 4) versucht.

3,2,3

Abb. 4 zeigt die Beeinflussung des Einbaues von markiertem Aspartat durch Cytosin. Durch Konzentrationen von 1 $\mu\text{Mol/ml}$ wird der Einbau in die Base Cytosin sowohl der RNS und DNS leicht verringert. Bei höheren Konzentrationen zeigt sich keine Verstärkung dieses Effekts, sondern es stellt sich ein konstanter Spiegel ein. Die maximale Hemmung liegt bei etwa 10%.

Ganz anders als beim Einbau in das Cytosin sind die Verhältnisse beim Einbau in die Pyrimidinbasen Uracil der RNS und Thymin der DNS. Durch Konzentrationen von 1 - 2 $\mu\text{Mol/ml}$ wird die Inkorporation von Aspartat in das Uracil der RNS um etwa 10% verringert. Bei höheren Konzentrationen steigt der Einbau wieder an, erreicht bei 2,5 $\mu\text{Mol/ml}$ den Wert der Kontrolle und überschreitet ihn beträchtlich. Bei 7,5 $\mu\text{Mol/ml}$ beträgt die Steigerung des Einbaues 15%.

Wieder ein anderes Verhalten zeigt der Einbau von Aspartat in das Thymin der DNS. Schon geringe Konzentrationen an Cytosin steigern den Einbau beträchtlich. Bei 1 - 2 $\mu\text{Mol/ml}$ erreicht der Einbau mit fast 30% Steigerung ein Maximum. Bei höheren Konzentrationen kommt es zu einer geringeren Erhöhung der Inkorporation. Bei 7,5 $\mu\text{Mol/ml}$ beträgt die Steigerung nur noch 10%. Eine Erklärung für dieses Verhalten konnte nicht gefunden werden.

Beeinflussung des Einbaus von L-C¹⁴-Aspartat durch Cytosin

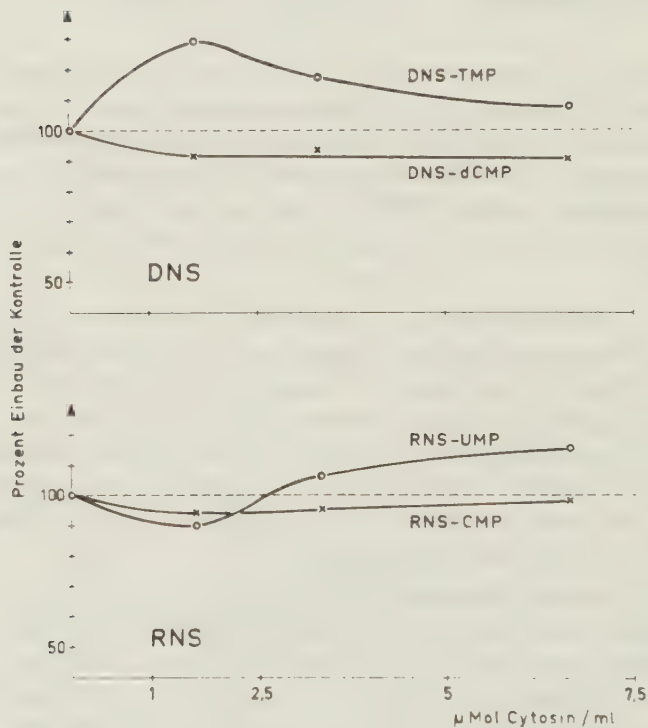


Abbildung 4

Beeinflussung des Einbaus von L-C¹⁴-Aspartat durch Cytidin

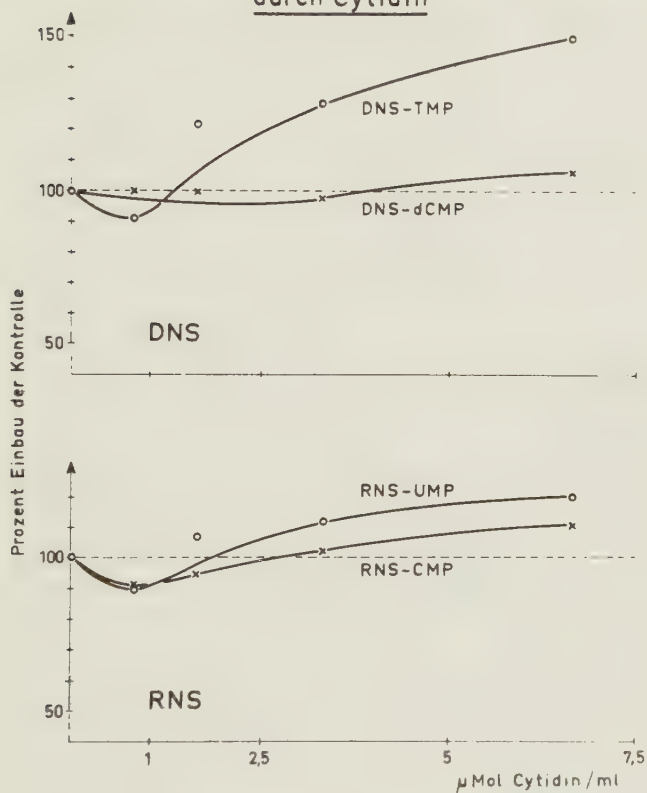


Abbildung 5

3,2,4

Noch ausgeprägter als bei der Base Cytosin sind die Veränderungen der Inkorporation von Aspartat in Gegenwart des Nucleosids Cytidin (Abb. 5). Auffallend ist auch hier, daß die Veränderungen des Einbaues in die Base Cytosin sowohl der RNS wie auch der DNS sehr viel geringer ausgeprägt sind als die Veränderungen des Einbaues in Uracil der RNS und Thymin der DNS. Durch geringe Konzentrationen an Cytidin wird der Einbau in Cytosin der RNS und DNS um etwa 10% verringert. Bei höheren Konzentrationen an Cytidin als 3 $\mu\text{Mol/ml}$ kommt es dagegen zu einer Erhöhung des Einbaues um etwa 10%. Auch bei der Inkorporation von markiertem Aspartat in das Uracil der RNS und in das Thymin der DNS kommt es durch geringe Konzentrationen von ungefähr 1 $\mu\text{Mol/ml}$ an Cytidin zu einer Verringerung. Höhere Konzentrationen führen auch hier zu einer Steigerung des Einbaues. Gegenüber der Beeinflussung des Einbaues in Cytosin bestehen jedoch zwei beträchtliche Unterschiede: Erstens sind die Konzentrationen, die bereits zu einer Steigerung führen, erheblich geringer. Sie liegen bei etwa 1,5 $\mu\text{Mol/ml}$. Zum anderen ist die Erhöhung der Inkorporation viel stärker ausgeprägt. Diese beträgt bei der Inkorporation in das Uracil der RNS bei 7,5 $\mu\text{Mol/ml}$ Cytidin ungefähr 20%, bei der Inkorporation in Thymin der DNS bei derselben Konzentration an Cytidin 50%. Insgesamt läßt sich sagen, daß durch Cytosin und Cytidin der Einbau von markiertem Aspartat in die Basen Uracil und Thymin stärker beeinflußt wird als der Einbau in die Base Cytosin. Die Veränderungen, die durch das Nucleosid Cytidin hervorgerufen werden, sind insgesamt wesentlich stärker ausgeprägt. Es wird in der Diskussion versucht, diese Befunde zu deuten.

3,2,5

Abb. 6 zeigt die Beeinflussung des Einbaues von markiertem Aspartat in die Pyrimidinbasen durch Thymin. Durch Thyminkonzentrationen von 2 $\mu\text{Mol/ml}$ wird der Einbau in alle vier Basen verringert. Bei höheren Konzentrationen kommt es zu

Beeinflussung des Einbaus von L-C¹⁴-Aspartat durch Thymin

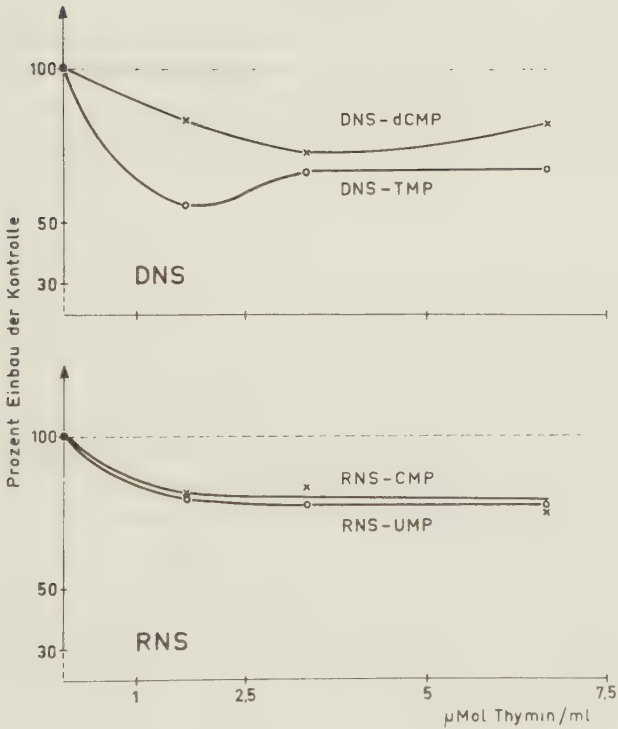


Abbildung 6

keiner weiteren Verringerung, sondern die Hemmung der Inkorporation erreicht einen konstanten Wert. Gleichermäßen bei RNS und DNS ist die Beeinflussung des Einbaues in Cytosin geringer ausgeprägt als die des Einbaues in Uracil bzw. Thymin, jedoch sind die Unterschiede gering. Bei den RNS-Basen erreicht diese einen Wert von ungefähr 20%, bei den DNS-Basen wird die Inkorporation in das Cytosin um 25%, in das Thymin um etwa 45% verringert. Die Beeinflussung des Einbaues in die Basen der DNS ist damit etwa doppelt so groß wie die Beeinflussung des Einbaues in die Basen der RNS.

3,2,6

Analog zu den Verhältnissen bei der freien Base Thymin ist das Bild beim Nucleosid Thymidin (Abb. 7). Auch hier sind sowohl bei RNS als auch DNS die Beeinflussungen des Einbaues von Aspartat in Cytosin schwächer ausgeprägt als die Beeinflussung des Einbaues in die Basen Uracil und Thymin. Im Gegensatz zur freien Base sind die Unterschiede ausgeprägter. Bei allen vier Basen kommt es schon durch geringe Konzentrationen zu einer Verringerung des Einbaues, die bei höheren Konzentrationen nicht zunimmt, sondern sich einem konstanten Wert nähert. Bei diesem Experiment ist allerdings zu bemerken, daß die einzelnen Meßpunkte eine breitere Streuung zeigen als bei den vorhergehenden Experimenten und dadurch eine Deutung dieser Beobachtungen erschweren.

Die stärkste Hemmung, die durch Thymidin auf den Einbau von Aspartat in das Cytosin der RNS und DNS erzielt wird, beträgt etwa 20%. Beim Uracil der RNS wird eine Verringerung des Einbaues um 30% beobachtet, beim Thymin der DNS um etwa 35%. Bei dem Nucleosid Thymidin zeigt es sich, daß die Effekte auf den Einbau in die Basen der DNS nicht stärker ausgeprägt sind als auf den Einbau in die Basen der RNS.

Beeinflussung des Einbaus von L-C¹⁴-Aspartat durch Thymidin

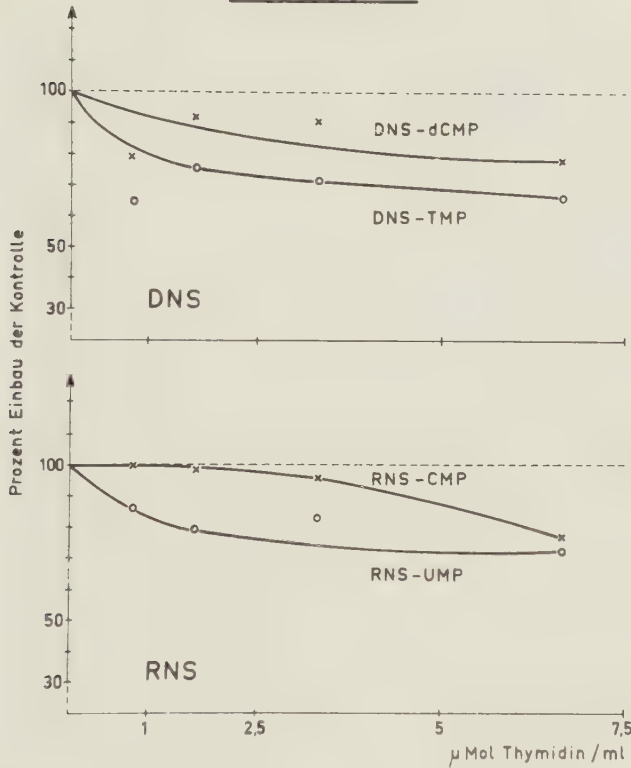


Abbildung 7

3,3

In den vorhergehenden Experimenten wurde mittels C^{14} -Aspartateinbau die de novo Synthese aller Pyrimidinnucleotide der RNS und der DNS in Gegenwart von Basen oder Nucleosiden untersucht. Dabei erfolgt der Einbau von Aspartat über die ganze Reaktionssequenz der Pyrimidinnucleotid- de novo Synthese. Im folgenden Experiment wird die de novo Synthese von Thyminnucleotiden untersucht. Als Maß für die de novo Synthese der Thyminnucleotide läßt sich die Inkorporation von C^{14} -markierten C_1 -Verbindungen, die die Methylgruppe des Thymins liefern (Formaldehyd oder Ameisensäure bzw. die Hydroxymethylgruppe des Serins) als Maß für die Nucleotidsynthese verwenden. Bei diesem Prozeß wird Ameisensäure (41) unter Verbrauch von ATP zur N_{10} -Formyltetrahydrofolsäure aktiviert. Diese wiederum kann unter Abgabe eines Protons in die N_5, N_{10} -Methenyl-tetrahydrofolsäure überführt und mittels $NADPH_2$ als Wasserstoffdonator zur N_5, N_{10} -Methylen-tetrahydrofolsäure reduziert werden. Von dieser Verbindung ausgehend erfolgt dann die Übertragung der Methylgruppe auf Desoxyuridin-5'-monophosphat, wobei Thymidin-5'-monophosphat entsteht (siehe auch 1,3). Im Gegensatz zur Aspartatinkorporation, die den ersten Schritt der ganzen Biosynthese-sequenz bildet, wird bei dieser Reaktion die Markierung erst bei einem der letzten Schritte der Sequenz eingeführt und ist dadurch spezifisch für die Thyminnucleotide. Die Ausführung des Versuches wurde bereits früher beschrieben (siehe 2,2). Das Ergebnis wird in Abb. 8 wiedergegeben. Es zeigt sich, daß sowohl durch die freie Base Thymin als auch durch das Nucleosid Thymidin der Einbau von markierter Ameisensäure und damit die de novo Synthese von Thyminnucleotiden sehr wesentlich beeinflusst wird. Durch die freie Base wird der Formiateinbau in einer Konzentration von $0,1 \mu\text{Mol/ml}$ ($= 10^{-4} \text{ M}$) um etwa 20% verringert und nimmt dann bei steigenden Konzentrationen an Thymin nicht wesentlich weiter ab. Durch das Thymidin wird dagegen in einer Konzentration von 10^{-4} M der Formiateinbau bereits um 50% verringert und fällt mit steigenden Konzentrationen an Thymidin noch langsam weiter ab.

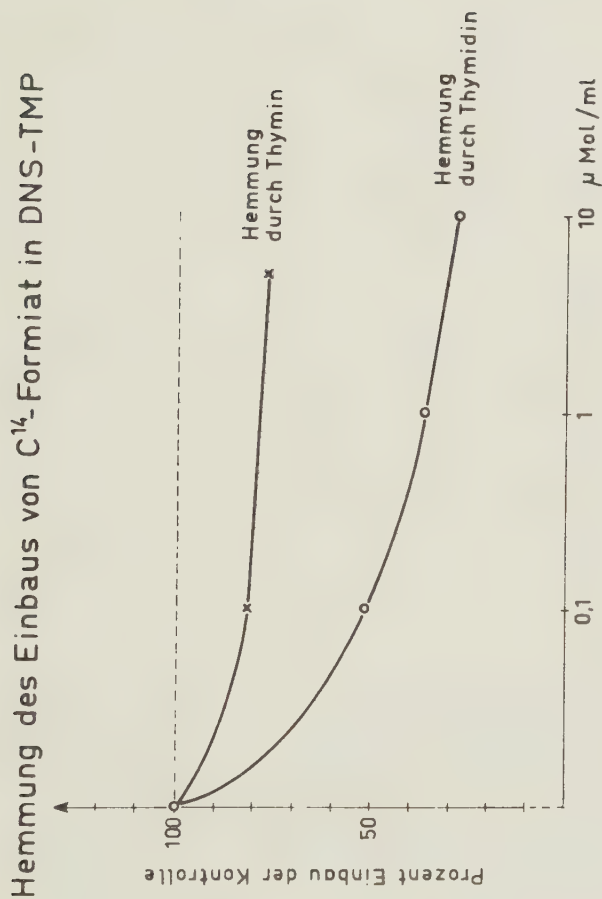


Abbildung 8

4. Diskussion

Im vorhergehenden Abschnitt wurden Experimente beschrieben, aus denen hervorgeht, daß es bei der Biosynthese der Pyrimidinnucleotide zu Wechselwirkungen zwischen Prozessen der eigentlichen de novo Synthese - gemessen an der Inkorporation der Bausteine Aspartat und Formiat - und der Verwertung präformierter Basen und Nucleoside, dem sogenannten "salvage pathway", kommt. Durch Pyrimidinnucleoside und Pyrimidinbasen wird bei Konzentrationen von 10^{-3} M in fast allen Fällen der Einbau von Aspartat verringert. Dabei zeigen die Nucleoside eine stärkere Wirkung als die entsprechenden Basen. Durch höhere Konzentrationen an Basen und Nucleosiden läßt sich in den meisten Fällen der Einbau von Aspartat nicht weiter verringern. Vielmehr kommt es zur Einstellung eines konstanten Hemmspiegels oder sogar wie bei Cytosin und Cytidin zu einer Steigerung des Einbaues, der beträchtlich den Kontrollwert überschreiten kann. Die dabei bei den einzelnen Basen und Nucleosiden beobachteten Unterschiede in der Beeinflussung der Inkorporation markierter Vorstufen der de novo Synthese werden später zu erklären versucht.

Übereinstimmend sind an den untersuchten Ehrlich-Ascites-Tumor-Zellen recht hohe Konzentrationen an Basen oder Nucleosiden erforderlich, um den Prozeß der de novo Synthese der Pyrimidinnucleotide wesentlich zu beeinflussen. Dies ist bemerkenswert, da besonders Nucleoside sehr rasch von Ascites-Tumor-Zellen aufgenommen werden (40). Die Ursache dieses widersprüchlichen Verhaltens könnte man in Unterschieden in der Aktivität und dem kinetischen Verhalten der Enzyme suchen, die Pyrimidinbasen und Nucleoside in der Zelle in Nucleotide überführen und damit der Nucleinsäuresynthese zuführen, und dem Verhalten der Enzyme, durch die Basen und Nucleoside abgebaut werden.

Der Abbau der Pyrimidinnucleoside verläuft über die freien Basen (zusammenfassende Darstellung: (63)). Diese werden aus den Nucleosiden durch Phosphorolyse freigesetzt. Umgekehrt können jedoch auch Nucleoside und Desoxyribonucleoside aus freien Basen durch dieselben Reaktionen gebildet werden (siehe 1,5). Die Aktivität der Phosphorylasen, durch die diese Reaktionen katalysiert werden, sind in tierischen Geweben recht hoch (40,62). Dazu zeigen die Aktivitäten dieser Enzyme bei Änderungen ihrer Wachstumseigenschaften durch exogene Bedingungen, z.B. in der Leber beim Einsetzen der Proliferation nach 2/3. Resektion (89,32,33) charakteristische Veränderungen: Parallel zum Ablauf der Proliferationsvorgänge kommt es zu einem Abfall der Enzymaktivitäten. Dieses Verhalten zeigen nicht nur die Nucleosidphosphorylasen, sondern auch die weiteren Enzyme, durch die die Basen abgebaut werden.

Die Verwertung der Nucleoside für die Nucleotidsynthese - und auch der Basen, sofern diese über die Nucleoside verwertet werden (siehe 1,5 und Abb. 1) - setzt mit der Phosphorylierung der Nucleoside zu Nucleosid-5'-monophosphaten durch ATP-abhängige Kinasen (17) ein (siehe auch 1,5). Diese Enzyme werden in tierischen Geweben mit Aktivitäten gefunden, die zwei bis drei Zehnerpotenzen unter den Aktivitäten der Phosphorylasen liegen (17,34,8). Im Gegensatz zu den Phosphorylasen und den Enzymen des Basenkatabolismus steigen die Aktivitäten dieser anabolen Enzyme in Geweben beim Einsetzen von Proliferationsvorgängen an (5,9). Zum Beispiel kommt es nach Infektion tierischer Zellen in der Gewebekultur mit Vaccine-Virus oder Herpes-Virus zur Induktion neuer, virusspezifischer Nucleosidkinasen (43,44), vor allem der Thymidinkinasen. Die Aktivität dieser Kinasen wird weiter allosterisch durch Thymidinnucleotide beeinflusst (13,11). Dabei ist ein gegensätzliches Verhalten der Monophosphate einerseits und Di- und Triphosphate andererseits zu beobachten. Während die Monophosphate die Kinasen aktivieren, hemmen die höheren Phosphate diese. Durch exogene Einflüsse

wie z.B. durch Leberresektion oder Röntgenbestrahlung ausgelöste Proliferationsvorgänge und Änderungen der Zusammensetzung und des Verhältnisses der verschiedenen Phosphorylierungsstufen der Nucleotide führen so zu Veränderungen der Aktivitäten der Enzyme, durch die der Zelle zugeführte Pyrimidinbasen oder Nucleoside umgesetzt werden: Die Aktivität der Enzyme der katabolischen Reaktionssequenz nimmt ab, während die Aktivität der Kinasen, durch die Nucleoside in Nucleotide überführt werden, ansteigt.

Hierdurch wird erreicht, daß bei erhöhtem Nucleotidbedarf bei Proliferationsvorgängen vermehrt Nucleotide aus Nucleosiden, also über den salvage pathway gebildet werden können. Allerdings ist zu beachten, daß für genauere Aussagen über die Umsetzungen der gleichen Substanz über zwei verschiedene Reaktionssequenzen - im vorliegenden Fall einer anabolischen und einer katabolischen - auch eine genaue Kenntnis der kinetischen Daten der beteiligten Enzyme erforderlich wäre. Leider liegen über die vorstehend diskutierten Reaktionen bisher nur spärliche Angaben vor.

In den oben beschriebenen Versuchen zeigen Cytosin und Cytidin in ihrer Wirkung auf die Aspartatinkorporation ein Verhalten, das von dem der anderen Basen und Nucleoside erheblich abweicht, da beide bei höheren Konzentrationen in fast allen Fällen zu einer Steigerung der Aspartatinkorporation führen. Diese Beobachtungen lassen sich bisher nicht befriedigend erklären. Es ist jedoch zu beachten, daß nach bisher vorliegenden Untersuchungen Cytidin und Desoxycytidin im Nucleosidstoffwechsel eine Sonderstellung einnehmen (63), da diese Nucleoside von den Zellen weder zu den entsprechenden Nucleotiden phosphoryliert werden können noch phosphorolytisch in die freie Base und in Zuckerphosphate gespalten werden können. Vielmehr ist vorher stets eine Desaminierung zu Uridin bzw. Desoxyuridin erforderlich. Enzyme, die diese Reaktion katalysieren, wurden in vielen Zellen nachgewiesen (76,19,26). Cytosin kann verwertet werden, indem es

entweder zuerst zu Uracil desaminiert wird oder in das Nucleosid Cytidin überführt wird. In beiden Fällen muß es somit vor der Verwertung zur Nucleotidsynthese desaminiert werden, zeigt also ein analoges Verhalten zum Nucleosid. Die Desaminierungen verlaufen in der Zelle relativ langsam. Dadurch wird in den Zellen wahrscheinlich nicht soviel Uridin, Desoxyuridin und Uracil gebildet, daß diese in nennenswertem Maße zur Nucleotidsynthese verwandt werden können, sondern sofort abgebaut werden. Ob jedoch diesem Verhalten eine Bedeutung für die Erklärung der bei der Beeinflussung der Aspartatinkorporation in Gegenwart von Cytidin und Cytosin beobachteten Ergebnisse zukommt, ist ungewiß.

Keine sehr wesentlichen Unterschiede zeigen die Wirkungen von Thymin und Thymidin auf die Inkorporation von Aspartat und Formiat in die Thymidinnucleotide der DNS (vergl. Abb. 6, 7 und 8). Dieses Ergebnis ist zu erwarten, da sowohl Aspartat- wie Formiateinbau durch den de novo Syntheseweg erfolgen.

Wie im einzelnen die beobachteten Veränderungen der de novo Synthese von Nucleotiden in Gegenwart von präformierten Basen oder Nucleosiden zustande kommen, läßt sich auf Grund der vorhergehenden Experimente nicht entscheiden. Einmal können die Aktivität und deren Veränderung sowie das kinetische Verhalten der oben diskutierten Enzyme sehr wesentlich das Zusammenspiel der de novo Synthese und der Verwertung von Vorstufen beeinflussen. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, daß die exogen zugeführten Basen und Nucleoside einzelne Enzyme, die an der de novo Synthese beteiligt sind, hemmen oder aktivieren und dadurch die Kapazität der de novo Synthese verändern. Bei einer Reihe von Enzymen der Pyrimidinnucleotid-Biosynthese werden derartige Allosterie-Effekte beobachtet.

Als Beispiele besonders gut untersuchter Enzyme seien die Aspartattranscarbamylase (14,15) und die Cytidin-5'-phosphat-desaminase (23) erwähnt. Dabei erscheint es wahrscheinlich (14), daß die eigentlichen Aktivatoren bzw. Inhibitoren der Enzyme die Nucleosid-5'-phosphate in der tierischen Zelle sind, so daß auch hier dem Verhalten der Kinasen eine wesentliche Bedeutung zukäme. Es ist fraglich, ob in vivo derart hohe Nucleosid- oder Nucleotidkonzentrationen vorhanden sind, daß diesen Vorgängen eine physiologische Bedeutung zukommt (90).

Von Bedeutung sind die vorstehenden Beobachtungen jedoch für die kritische Beurteilung von Experimenten zur Messung der RNS- und DNS-Synthese durch Einbau markierter Basen oder Nucleoside, besonders von ^3H -Thyminidin, ^3H -Uridin und ^3H -Cytidin (24,67,82). In den vorstehenden Experimenten wird gezeigt, daß die de novo Synthese von Pyrimidinnucleotiden quantitativ erst durch recht hohe Konzentrationen an präformierten Basen und Nucleosiden beeinflusst wird. Demnach ist anzunehmen, daß von den präformierten Vorstufen nur ein recht geringer Teil für die DNS- und RNS-Synthese verwendet wird. Diese Verwendung von präformierten Vorstufen der Nucleotide für die Nucleinsäuresynthese kann für quantitative Aussagen Verwendung finden, wenn das Verhältnis von de novo Synthese und Vorstufenverwertung konstant ist. Tritt jedoch, wie es bei Proliferationsvorgängen der Fall ist, eine Änderung in den Aktivitätsspiegeln der Enzyme für den Nucleosidkatabolismus und für die Nucleotidbildung aus Nucleosiden ein, so kann sich auch das Verhältnis von de novo Synthese und Vorstufenverwertung bei der Nucleinsäuresynthese verändern. In dieser Situation sind quantitative Aussagen über die Nucleinsäuresynthese durch Messung des Einbaues von markierten Nucleosiden nur noch zulässig, wenn die Änderungen des Verhältnisses zwischen de novo Synthese und Vorstufenverwertung bekannt sind.

5. Zusammenfassung

Die Beeinflussung der de novo Synthese der Pyrimidinnucleotide durch präformierte Basen und Nucleoside wird an Ehrlich-Ascites-Tumorzellen untersucht. Die de novo Synthese wird durch den Einbau von C^{14} -Aspartat in die Pyrimidinnucleotide, im Fall der Thyminnucleotide auch durch den Einbau von C^{14} -Formiat gemessen. Als präformierte Bausteine werden die Basen Uracil, Cytosin und Thymin, sowie die Nucleoside Uridin, Cytidin und Thymidin in steigenden Konzentrationen zugesetzt.

In Konzentrationen von 10^{-3} M hemmen fast alle Basen und Nucleoside den Einbau des Aspartats bzw. Formiats. Bei höheren Konzentrationen kommt es zu keiner stärkeren Verringerung der Inkorporation, sondern zur Einstellung eines konstanten Spiegels. Eine Abweichung von diesem Verhalten zeigen Cytosin und Cytidin, bei denen eine Erhöhung der Konzentration zu einer Steigerung der Inkorporation führt, die beträchtlich die Kontrolle überschreiten kann.

Die möglichen Ursachen dafür, daß recht hohe Konzentrationen zur Erzielung wesentlicher Effekte nötig sind, werden diskutiert. Es wird versucht, Anhaltspunkte für das unterschiedliche Verhalten der einzelnen Basen und Nucleoside zu finden. Auf die Bedeutung der Beeinflussung von de novo Synthese durch präformierte Bausteine für autoradiographische Arbeiten wird hingewiesen.

6. literatur

- 1 R. Abrams and J.M. Goldinger, Arch. Biochem. Biophys. 35, 234 (1952)
- 2 R. Abrams and J.M. Goldinger, Arch. Biochem. Biophys. 30, 261 (1951)
- 3 F.K. Bagatell, E.M. Wright and H.Z. Sable, J. Biol. Chem. 234, 1369 (1959)
- 4 G.B. Beaven, E. Holyday and E.A. Johnson in "The Nucleic Acids, E. Chargaff and J.N. Davidson, eds.; Academic Press, New York 1955
- 5 R.M. Behki and W.S. Morgan, Arch. Biochem. Biophys. 107, 427 (1964)
- 6 A. Benich, H. Getler and G.B. Brown, J. Biol. Chem. 177, 565 (1949)
- 7 P. Berg and W.K. Joklik, Nature 172, 1008 (1953)
- 8 P.A. Bianchi, J.A.V. Butler, A.R. Crathorn and K.V. Shooter, Biochim. Biophys. Acta 53, 123 (1961)
- 9 P.A. Bianchi, A.R. Crathorn and K.V. Shooter, Biochim. Biophys. Acta 61, 728 (1962)
- 10 F.J. Bollum and V.R. Potter, J. Amer. Chem. Soc. 79, 3603 (1957)
- 11 T.R. Breitmann, Biochim. Biophys. Acta 67, 153 (1963)
- 12 E. Bresnick, Advances in Enzyme Regulation 2, 213 (1964)
- 13 E. Bresnick, U.B. Thompson, H.P. Morris, A.G. Liebelt, Biochem. Biophys. Res. Comm. 16, 278 (1964)
- 14 E. Bresnick and G.R. Hitchings, Cancer Res. 21, 105 (1961)
- 15 E. Bresnick, Cancer Res. 22, 1264 (1962)
- 16 E.S. Cannellakis, J. Biol. Chem. 227, 701 (1957)
- 17 E.S. Cannellakis, J. Biol. Chem. 227, 329 (1957)
- 18 E. Chargaff and J. Kream, J. Biol. Chem. 175, 993 (1948)
- 19 E.J. Conway and R. Cooke, Biochem. J. 33, 457 (1939)
- 20 J. Crawford, A. Kornberg and E.S. Simms, J. Biol. Chem. 226, 1093 (1957)
- 21 C.H. De Verdier and V.R. Potter, J. Nat. Cancer Inst. 24, 13 (1960)
- 22 F.J. Di Carlo, A.S. Schultz, D.M. Roll and G.B. Brown, J. Biol. Chem. 180, 329 (1949)
- 23 S. Fiala and A. Fiala, Cancer Res. 25, 922 (1965)

- 24 A. Ficq in "The Cell" (J. Brachet and A.E. Mirsky, eds.)
Vol. I, S. 67, Academic Press,
Inc., New York 1959
- 25 A. Fleck and H.N. Munro, Biochim. Biophys. Acta 55, 571
(1962)
- 26 E. Förster, Dissertation Freiburg 1966
- 27 M. Friedkin and A. Kornberg in "The chemical Basis of
Heredity" (W.D. Mc Elroy and
B. Glass, eds.), John Hopkins
Press, Baltimore 1957, S. 609
- 28 M. Friedkin and H. Wood, J. Biol. Chem. 220, 639 (1956)
- 29 M. Friedkin, D. Tilson and D. Roberts, J. Biol. Chem.
220, 627 (1956)
- 30 M. Friedkin and D. Roberts, J. Biol. Chem. 207, 257 (1954)
- 31 H.C. Friedmann and B. Vennesland, J. Biol. Chem. 233, 1398
(1958); 235, 1526 (1960)
- 32 P. Fritzson, Biochim. Biophys. Acta 91, 374 (1964)
- 33 P. Fritzson, J. Biol. Chem. 237, 150 (1962)
- 34 H.J. Grav and R.M.S. Smellie, Biochem. J. 94, 518 (1965)
- 35 D.P. Groth and N. Jiang, Biochem. Biophys. Res. Comm. 22,
62 (1966)
- 36 E. Hammarsten, P. Reichard and E. Saluste, Acta Chem.
Scand. 3, 433 (1949); J. Biol.
Chem. 183, 105 (1950)
- 37 L.I. Hecht and V.R. Potter, Cancer Res. 16, 999 (1956)
- 38 C. Heidelberger, K.C. Liebman, E. Harbers and P.M. Bhar-
gava, Cancer Res. 17, 399 (1957)
- 39 E. Herbert, V.R. Potter and L.I. Hecht, J. Biol. Chem.
225, 659 (1957)
- 40 J.A. Jacquez, Biochim. Biophys. Acta 61, 265 (1962)
- 41 L. Jaenicke and C. Kutzbach, Fortschr. Chem. org. Natur-
stoffe 21, 183 (1963)
- 42 H.O. Kammen and R.B. Hurlbert, Biochim. Biophys. Acta 30,
195 (1958)
- 43 S. Kit, L.J. Pierarski and D.R. Dubbs, J. Mol. Biol. 6,
22 (1963)
- 44 S. Kit and D.R. Dubbs, Virology 26, 16 (1965)
- 45 A. Kornberg, Advances in Enzymol. 18, 191 (1957)
- 46 A. Kornberg in "Enzymatic Synthesis of DNA", John Wiley
and Sons, Inc., New York 1961

- 47 L.M. Kozloff, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 18,
1209 (1953)
- 48 H.A. Krebs and R. Hems., Biochim. Biophys. Acta 12, 172
(1953)
- 49 J. Leslie in "The Nucleic Acids" (E. Chargaff and J.N.
Davidson, eds.), Vol. II, S. 1;
Academic Press, Inc., New York 1955
- 50 I. Liebermann and A. Kornberg, J. Biol. Chem. 207, 911
(1954)
- 51 I. Liebermann and A. Kornberg, Biochim. Biophys. Acta 12,
223 (1953)
- 52 I. Liebermann, A. Kornberg and E.S. Simms, J. Biol. Chem.
215, 403 (1955)
- 53 I. Liebermann, A. Kornberg and E.S. Simms, J. Biol. Chem.
215, 389 (1955)
- 54 I. liebermann, J. Biol. Chem. 222, 765 (1956)
- 55 F. Maley and S. Ochoa, J. Biol. Chem. 233, 1538 (1958)
- 56 G.F. Maley and F. Maley, J. Biol. Chem. 234, 2975 (1959)
- 57 W.S. Mc Nutt, Biochem. J. 50, 384 (1952)
- 58 E.C. Moore and R.B. Hurlbert, Biochim. Biophys. Acta 55,
651 (1962)
- 59 T. Okazaki and A. Kornberg, J. Biol. Chem. 239, 259;
269 (1964)
- 60 L.M. Peage and F. Schlenk, Arch. Biochem. Biophys. 40,
42 (1952)
- 61 A.A. Plentl and R. Schoenheimer, J. Biol. Chem. 153, 203
(1944)
- 62 H. Pontis, G. Degenstedt and P. Reichard, Biochim. Bio-
phys. Acta 51, 138 (1961)
- 63 V.R. Potter "Nucleic Acid Outlines", Vol. I, S. 217,
Burgess Publishing Co., Minnea-
polis 1960
- 64 W.E. Pricer Jr. and B.L. Horecker, J. Biol. Chem. 235,
1292 (1960)
- 65 W.H. Prusoff, J. Biol. Chem. 231, 873 (1958)
- 66 E. Racker, J. Biol. Chem. 167, 843 (1947)
- 67 M.F. Rajewsky, Biophysik 3, 65 (1966)
- 68 W.E. Razzel and H.G. Khorana, Biochim. Biophys. Acta 28,
562 (1958)
- 69 P. Reichard and G. Hanshoff, Acta chem. Scand. 9, 519
(1955)

- 70 P. Reichard, J. Biol. Chem. 263, 2511 (1961)
- 71 P. Reichard, Acta Chem. Scand. 9, 1275 (1955)
- 72 P.M. Roll, G.B. Brown, F.J. Di Carlo and A.S. Schultz,
J. Biol. Chem. 180, 333 (1949)
- 73 A.H. Roush and R.F. Betz, J. Biol. Chem. 233, 261 (1958)
- 74 R.J. Rutman, A. Cantarow and G.B. Brown, Cancer Res. 14,
119 (1954)
- 75 E. Scarano, J. Biol. Chem. 235, 706 (1960)
- 76 G. Schmidt, Z. Physiol. Chem. 208, 185 (1932)
- 77 Zusammenfassung: M. Schulman in "Metabolic Pathways"
(D.M. Greenberg, ed.), Vol. II,
S. 389, Academic Press, New York
and London 1961
- 78 L. Siminovitch and A.F. Graham, Canad. J. Microbiol. 1,
721 (1955)
- 79 R.M.S. Smellie "The Biosynthesis of Ribonucleic Acid in
Animal Systems", Academic Press,
New York and London 1963
- 80 C.G. Smith and J.A. Bernstein, Biochim. Biophys. Acta 52,
184 (1961)
- 81 A. Stevens and J. Henry, J. Biol. Chem. 239, 196 (1964)
- 82 P.A. Stewart, H. Quastler, M.R. Skougaard, P.R. Wimber,
M.F. Wolfsberg, C.A. Perrotta, B. Farbel and M. Carlough,
Rad. Res. 24, 521 (1965)
- 83 J.L. Strominger, L.A. Heppel and E.S. Maxwell, Biochim.
Biophys. Acta 32, 412 (1959)
- 84 W.W. Umbreit, R.M. Burris and J.F. Stauffer "Manometric
Techniques, Burgess Publishing
Comp., 3rd Edition, 1957
- 85 A.J. Wahba and M. Friedkin, J. Biol. Chem. 237, 3794
(1962)
- 86 A.C. Wilson and A.B. Pardee in "comparative Biochemistry"
(M. Florkin and H.S. Mason, eds.),
Vol. VI, S. 73, Academic Press,
New York and London 1964
- 87 R.G. Wyatt, Biochem. J. 48, 584 (1951)
- 88 R.G. Wyatt in "The Nucleic Acids" (E. Chargaff and J.N.
Davidson, eds.), Vol. I, S. 243;
Academic Press, Inc., New York
1955
- 89 E.W. Yamada, Biochem. Biophys. Res. Comm. 8, 232 (1962)
- 90 O. Zinsser, A.W. Holldorf und P. Obrecht, Strahlenthera-
pie, im Druck

Lebenslauf

Am 28.6.1941 wurde ich, Klaus Resch, als Sohn des Beamten Johann Resch und seiner Ehefrau Gertrud geboren. Im Herbst 1947 wurde ich in Oberpfalz eingeschult. Vom Herbst 1951 bis zum Frühjahr 1960 besuchte ich das altsprachliche Bismarckgymnasium in Karlsruhe. Anschließend studierte ich in Heidelberg zwei Semester Physik. Dann wechselte ich auf Medizin über. Ich studierte Medizin in Heidelberg, Berlin, München und Freiburg. Die ärztliche Vorprüfung bestand ich im April 1963 in Berlin. Die ärztliche Staatsprüfung legte ich im Juli 1966 in Freiburg ab.

